риод и эффект иммуностимуляции / С.П. Дьякова, Л.С. Ермолова, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский // Сельскохозяйственная биология. Серия «Биология животных». – 2008. - № 6. – С. 100-103.

5.Корса-Вавилова, Е.В. Опыт применения озоновых технологий при производстве инкубационных яиц / Е.В. Корса-Вавилова, А.К. Османян и др. // Птица и птицепродукты.- 2011.-№1.-С.42-44.

6.Кривопишин, И. Озонизация инкубационных яиц / И. Кривопишин // Птицеводство.-1970.-№5.-С.33-34.

7.Кривопишин, И. Совершенствование технологии инкубации яиц / И. Кривопишин // Птицеводство.-1984.-№11.-С.22-24.

8.Кузнецов, А. Прединкубационная обработка яиц / А. Кузнецов // Птицеводство.- 1989.-№11.-С.23-25.

9.Марков, Ю. Динамика накопления микрофлоры в инкубационных шкафах / Ю. Марков, В. Свириденко, С. Заика // Птицеводство.-1984.-№6.-С.32.

10.Нанос, В. Ценная продукция / В. Нанос // Птицеводство.-1998.- №2.- С.29.

11.Никитина В.А. Изыскание эффективной дрожжевой питательной среды для культивирования бактерий / В.А. Никитина, В.И. Бобрышев, Ф.И. Кафизова // Ученые записки Казанского гос. ветеринарного ин-та им. Н.Э. Баумана. - Казань, 1979. -С. 132-134.

12.Панова, Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис. …канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.07 / Н.В. Панова. – Ставрополь, 2006. – 173 с.

13.Пигарева, М.Д. Разведение перепелов / М.Д. Пигарева. – М.: Россельхозиздат, 1978.- 80 с.

14.Тимченко, Л.Д. Влияние нового биологически активного препарата «Биокомфорт» на ферментативную активность нейтрофилов лабораторных крыс заключительного периода онтогенеза при повреждении покровных тканей / Л.Д. Тимченко, М.В. Походенко, Е.Г. Затона, И.В. Ржепаковский // Аграрная Россия. – 2010. – № 2. – С. 32-34.

15.Thiele, M. Untersuchungen zur embryotoxizit t von ozon nach einer in ovo-begasung beim huhn: dis. … Dr. med. vet.: 11.10.11 / M. Thiele.-Leipzig, 2011.-129 p.

16. Патент 2197251 РФ. Способ приготовления биостимулятора эмбрионального / Л.Д. Тимченко; И.В. Ржепаковский; В.В. Михайленко; Л.А. Гнездилова; Л.И. Коляда (УР). № 2001110556/13: заявл. 17.04.2001; опубл. 27.01.2003, Бюл. № 3. – Ч. 3.

17.Патент 2283347 РФ Способ получения эмбрионального стимулятора роста микроорганизмов / Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, В.Н. Вакулин, Н.В. Косик (УР). № № 2004115830/13: заявл. 24.05.2004; опубл. 10.09.2006, Бюл. № 25.

Контактная информации об авторах для переписки

Сизоненко Марина Николаевна – аспирант кафедры ботаники, зоологии и общей биологии Института живых систем СКФУ, младший научный сотрудник ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» E-mail: risha_veresk@mail.ru

Катунина Людмила Семёновна - старший научный сотрудник лаборатории питательных сред ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

УДК619:615.9:612

Герунова Л.К., Околелов В.И., Пьянова Л.Г., Вовк А.А.
(ФГБОУ ВПО ОмГАУ имени П.А.Столыпина, ИППУ СО РАН, г.Омск)

ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ АВЕРСЕКТОМ-2, И КОРРЕКЦИИ ЭНТЕРОСОРБЕНТОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕТУЛИНОМ

Ключевые слова: Аверсект-2, энтеросорбент, бетулин, крысы, иммунная реактивность.

Введение. В настоящее время во всем мире ежедневно животным вводят более 10 млрд. доз лекарственных средств. На животноводческих предприятиях России практически нет коров, свиней, овец, коз и птиц, которые бы не получали те или иные фармакологические препараты [9]. Особенно широко используют противопаразитарные средства, поскольку в производственных условиях все сельскохозяйственные животные подвергаются ежегодной профилактической противопаразитарной обработке. Учитывая, что большинство противопаразитарных препаратов несет потенциальную опасность и способно вызывать нежелательные реакции у обрабатываемых животных, предъявляют высокие требования по безопасности к данной

группе лекарственных средств. Авермектинсодержащие средства принадлежат к группе биопестицидов и активно используются в растениеводстве и животноводстве. Средства данной группы относятся к 3-му классу опасности (умеренно опасные) [3] и сохраняют потенциальную возможность развития нежелательных реакций. Поскольку иммунная система неизбежно вовлекается в патологический процесс при любом химическом стрессе [2], не исключена возможность нарушения иммунной реактивности у продуктивных животных с развитием дистрофических изменений в органах иммуногенеза, что приводит к необратимым функциональным изменениям в организме, вызывающим преждевременную выбраковку [6]. В связи с этим особое внимание должно уделяться выявлению и устранению иммунотоксических эффектов в фармакодинамике лекарственных средств.

Цель исследования – установить изменения иммунной реактивности у лабораторных крыс при острой интоксикации Аверсектом-2 и фармакокоррекции углеродным энтеросорбентом, модифицированным бетулином.

Методика исследования. Исследование проводили на 20 белых беспородных лабораторных крысах - самцах в возрасте 6-ти месяцев с массой тела 260-290 г, содержащихся в условиях вивария на стандартном рационе. Для исследования было сформировано 4 группы животных по 5 особей в каждой (2 опытные и 2 контрольные). В эксперименте использовали противопаразитарный препарат Аверсект-2 (1% раствор аверсектина С) производства ООО НЦБ Фармбиомед (Москва, Россия) и углеродный энтеросорбент, модифицированный бетулином в этанольно-глицериновой основе (ИППУ СО РАН, г. Омск). Препарат Аверсект-2 вводили однократно подкожно в дозе 2 мг/кг массы животным двух опытных групп. Крысам 2-ой опытной группы после интоксикации в течение 3-х дней в утреннее кормление задавали болюсы с углеродным энтеросорбентом, модифицированным бетулином, в дозе 0,2 г/кг. Контрольными группами служили интактные животные. Показатели иммунной реактивности крыс исследовали через 14 суток после интоксикации. Подсчет количества лейкоцитов проводили в счетной камере Горяева. Лейкограмму и морфологию клеток определяли по мазкам крови, окрашенным по методу Романовского-Гимза. НСТ-тест (спонтанный и активированный) проводили по методике Стьюарта в модификации Нагоева (1975), фагоцитарную активность лейкоцитов крови определяли по методу Гостева (1950), уровень и размеры ЦИК устанавливали по методике Дижона. Статистическую обработку цифровых данных проводили в программе STATISTICA6.1rus, при этом сравнение средних проводили по непараметрическому критерию Вилкоксона-Манна-Уитни для независимых выборок.

Результаты исследования. При динамическом наблюдении за лейкограммой и уровнем лейкоцитов в периферической крови крыс в течение 14 суток после интоксикации Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг массы выявлено, что через 4 суток снижается процентное содержание моноцитов (1,00±0,55 против 5,20±0,49%, $p \leq 0{,}01$) по сравнению с группой контроля. Через 14 суток в лейкограмме крыс опытной группы снижается процентное содержание палочкоядерных нейтрофилов на 30% (1,40±0,24 против 2,00±0,00% в контроле, $p \leq 0{,}05$) и лимфоцитов – на 28% (44,60±4,03 против 61,80±2,22% в контроле, $p \leq 0{,}05$) на фоне увеличения количества сегментоядерных нейтрофилов (61,80±2,22 против 40,80±1,03%, $p \leq 0{,}05$). При проведении реакции на миелопероксидазу в мазках крови интоксицированных крыс установлено достоверное увеличение выхода в периферическую кровь незрелых форм гранулоцитов – метамиелоцитов (5,40±0,51 против 2,60±0,51% в контроле, $p \leq 0{,}05$).

Абсолютное содержание различных форм лейкоцитов в периферической крови крыс представлено на рисунке 1. Из анализа приведенных данных следует, что на 4-е сутки после введения Аверсекта-2 достоверно снижались следующие показатели: количество лейкоцитов (Лц) - на 48%, количество сегментоядерных нейтрофилов (С) - на 47% , лимфоцитов (Лф) - на 46% и моноцитов (Мн) - на 88% по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс, что свидетельствует об угнетении лейкопоэза. При анализе абсолютного содержания различных форм лейкоцитов в крови крыс через 14 суток после интоксикации отмечено продолжающееся снижение общего количества лейкоцитов с уменьшением выхода палочкоядерных нейтрофилов в периферическую кровь (рис.1)

Процентное содержание фагоцитирующих клеток достоверно возрастало через 14 суток после интоксикации в дозе 2 мг/кг по сравнению с группой контро-

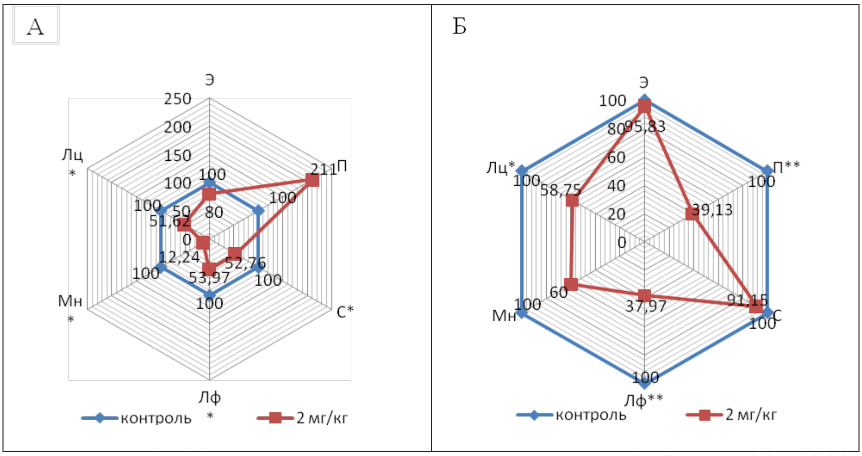

Рисунок 1 - Абсолютное содержание лейкоцитов в крови крыс (n=5) через 4 (А) и 14 (Б) суток после интоксикации Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг относительно контроля (100%).
Примечание : достоверность различий относительно контроля * - p≤0,05, ** - ≤0,01.

Таблица 1 – Показатели неспецифической резистентности крыс через 14 суток после интоксикации Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг и коррекции энтеросорбентом, модифицированным бетулином (M±m), n=5

Группы	Фагоцитоз с латексом %	НСТ-тест спонтанный, %	НСТ-тест активированный, %	ЦИК по Дижону, ед	Размер ЦИК
Аверсект-2 2 мг/кг	26,71±0,52 *	16,43±0,20 **	34,57±2,25 **	339,71±9,75 **	малый
Аверсект-2 2мг/кг + сорбент	20,29±1,43	16,14±0,63	38,14±1,64 **	148,71±3,63 **	средний
Контроль	23,43±0,30	14,43±0,30	25,29±0,52	415,43±3,30	средний

Примечание: достоверность различий относительно контроля * - p≤0,05, ** - p≤0,01.

ля (табл.1). Вместе с тем увеличились показатели спонтанного и активированного НСТ-тестов на 12% и 26% соответственно. В этот период в периферической крови преобладали ЦИК малых размеров, их общее количество было достоверно ниже регистрируемых ЦИК средних размеров у интактных крыс. Анализ показателей неспецифической резистентности при проведении коррекции показывает, что трехдневный курс энтеросорбции с применением бетулинсодержащего сорбента повышает спонтанный и активированный НСТ-тесты относительно группы интактных животных. Изменения размеров ЦИК у крыс с коррекцией энтеросорбентом с бетулином относительно интоксицированных животных заключаются в преобладании комплексов средних размеров.

При анализе изменений в периферической крови отмечено статистически достоверное увеличение абсолютного количества сегментоядерных нейтрофилов (2,92±0,11 против 2,54±0,10· 109/л в контроле, p≤0,05), другие показатели не имели достоверных отличий относительно таковых у интактных животных.

Особого внимания заслуживает изучение влияния токсических доз противопаразитарных средств на гемопоэз. Определение лейкограммы и подсчет общего количества лейкоцитов являются общедоступными методами исследования, которые дают представление о функциональном состоянии кроветворных органов и иммуной реактивности, что особенно важно для прогностической оценки постинтоксикационных осложнений. Установленные нами тенденции к снижению уровня лейкоцитов с развитием лейкопении при введении токсической дозы Аверсекта-2 имеют важное диагностическое значение. Возникновение лейкопении связано с нарушением продукции, со-

зревания и выхода лейкоцитов из костного мозга, а также с перераспределением их в кровеносном русле, что свидетельствует об угнетении иммунной реактивности организма и нарушении лейкопоэза [5]. При этом уменьшение абсолютного и относительного количества моноцитов расценивается как неблагоприятный признак, поскольку им отводится функция устранения разрушенных клеток путем эндоцитоза [8]. Установлено, что увеличение миелоидных элементов и их незрелых форм нередко сопутствует интоксикациям [1]. Выход незрелых гранулоцитов в периферическую кровь в данном случае можно расценивать как следствие компенсации потерь зрелых нейтрофилов вследствие токсического воздействия. Если рассматривать острую интоксикацию как стрессовое состояние, то регистрируемое нами повышение фагоцитарной активности нейтрофилов через 14 суток после интоксикации Аверсектом-2 закономерно. Активация фагоцитирующих клеток играет важную роль в повышении резистентности организма при стрессе [4]. Е.В. Кузьменко и др. также отмечают, что при остром стрессе у лабораторных крыс повышается фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови [7]. Таким образом, выявленное нами повышение значений спонтанного и активированного НСТ-тестов и фагоцитоза у интоксицированных крыс по сравнению с интактными животными свидетельствует о мобилизации неспецифических факторов защиты организма при действии токсического агента. В процессе исследований выявлено достоверное снижение уровня ЦИК у животных в экспериментальных условиях. Это может свидетельствовать об отложении иммунных комплексов в различных органах и тканях с последующим развитием воспалительной реакции и дистрофических процессов. В пользу этого предположения говорит и одна из важнейших характеристик иммунных комплексов – их размер. У животных, подвергнутых острой интоксикации, регистрировали комплексы преимущественно малого размера. Поскольку именно они относятся к наиболее патогенным иммунным комплексам и медленно элиминируют [10], то возможность их перехода в различные ткани особенно высока. Взаимодействие патогенных иммунных комплексов практически со всеми клетками крови и рецепторами тканей организма может являться причиной повреждения мембран и развития аутоиммунных процессов [11].

При выборе корригирующего средства в ветеринарии необходимо учитывать его доступность и ценовую категорию. В настоящее время наиболее доступным методом борьбы с интоксикацией в условиях промышленного животноводства является энтеросорбция. При этом особое место отводится углеродным энтеросорбентам, основным механизмом лечебного действия которых является поглощение токсичных веществ, попадающих в желудочно-кишечный тракт с водой или кормом. Проникновение в организм ксенобиотиков приводит к нарушению окислительного и энергетического гомеостаза и обусловленному этим угнетению неспецифической резистентности и иммунной реактивности, что способствует возникновению заболеваний печени. Известно, что авермектины в процессе биотрансформации адсорбируются в желудочно-кишечном тракте и выделяются преимущественно с фекалиями в виде метаболитов [12], поэтому для коррекции отмеченных нарушений целесообразно применять лекарственные препараты группы энтеросорбентов.

В результате проведенных исследований на крысах было установлено выраженное корригирующее действие бетулинсодержащего энтеросорбента, о чем свидетельствовали снижение показателя фагоцитоза и укрупнение размеров ЦИК до средней величины на фоне отравления Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг. Отсутствие достоверных различий в абсолютном содержании лейкоцитов и лейкограмме контрольных и опытных животных после энтеросорбции свидетельствует о выраженных иммуномодулирующих свойствах бетулина, обеспечивающих адаптацию лейкоцитов периферической крови к повреждающему действию Аверсекта-2. Достоверное увеличение показателей спонтанного и активированного НСТ–тестов у животных при применении сорбента, модифицированного бетулином, в лабораторных условиях позволяет судить о сохранении высокой бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов за счет активации кислородзависимых механизмов даже при снижении уровня фагоцитоза.

Выводы.

Острая интоксикация крыс Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг через 14 суток после затравки сопровождается активацией фагоцитоза (26,71±0,52 против 23,43±0,30% в контроле, $p \leq 0{,}05$), спонтанного и активированного НСТ-тестов (16,43±0,20 и 34,57±2,25% против 14,43±0,30 и

25,29±0,52% соответственно, p≤0,01) на фоне развития прогрессирующей лейкопении и абсолютной лимфоцитопении с появлением в периферической крови промиелоцитов, иммунобластов и лимфоцитов с вакуолизированной цитоплазмой, при этом уменьшается количество ЦИК, преобладают иммунные комплексы малых размеров.

Введение сорбента, модифицированного бетулином, в дозе 0,2 г/кг в течение 3-х суток после острой интоксикации Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг предотвращает развитие выраженных изменений в гемограмме у крыс и приводит к преобладанию ЦИК средних размеров, а также способствует снижению гиперактивного фагоцитоза.

Резюме: Острая интоксикация крыс Аверсектом-2 в дозе 2 мг/кг сопровождается активацией фагоцитоза и НСТ-тестов с формированием ЦИК малых размеров на фоне развития прогрессирующей лейкопении и абсолютной лимфоцитопении. Введение сорбента, модифицированного бетулином, в дозе 0,2 г/кг в течение 3-х суток после острой интоксикации Аверсектом-2 предотвращает развитие выраженных изменений в гемограмме у крыс и приводит к преобладанию ЦИК средних размеров, а также способствует снижению гиперактивного фагоцитоза.

SUMMARY
Acute intoxication of rats with Aversekt-2 at a dose of 2 mg/kg is accompanied by the activation of phagocytosis and NBT-tests as well as with the formation of small-sized CICs associated with the development of a progressive leukopenia and an absolute lymphocytopenia. Introduction of betulin modified sorbent at a dose of 0,2 g/kg within 3 days after an acute intoxication with Aversekt-2 prevents the development of pronounced changes in rats' hemogram and results in the formation of predominantly medium-sized CICs, as well as promotes decreasing hyperactive phagocytosis.

Keywords: Aversekt-2, enterosorbent, betulin, rats, immune reactivity.

Литература

1. Боляхина С. А. Влияние противопаразитарных кормовых гранул на про-цессы кроветворения / С. А. Боляхина // Сибирский вестник с.-х. науки. – 2008. - № 5 (185). – С. 115-119.
2. Герунов Т. В. Иммунотоксичность пестицидов: роль в патологии животных и человека / Т. В. Герунов, Ю. В. Редькин, Л. К. Герунова // Успехи современной биологии. - 2011. – № 5. – С. 474-482.
3. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые данные. - Режим доступа: http: //vsegost.com /Catalog/10/1048.shtml.
4. Иммунитет и стресс / Хаитов Р. М., Лесков В. П. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2001. – Т.87, №8. – С.1060-1073.
5. Интерпретация гематологических исследований / Л. М. Верхоглядова [и др.] // Ветеринарный Госпиталь. - №1. - 2005.- С.35-40.
6. Карпенко А. А. Естественная резистентность и иммунная реактивность высокопродуктивных коров / А. А. Карпенко // Ветеринария. – 2011. - № 7. – С. 13-15.
7. Кузьменко Е. В. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови крыс с различной реакцией на стресс / Е. В. Кузьменко, Н. А. Никифоров, М. О. Иваненко // Віснік Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія біологія. – 2010. – Вип. 11, № 905. – С. 173-177.
8. Ройтберг Г. Е. Лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний внутренних органов / Г. Е. Ройтберг, А. В. Струтынский. – М.: Бином, 1999. – 622с.
9. Смирнов А. М. Достижения и актуальные проблемы ветеринарной фармакологии и токсикологии / А. М. Смирнов // Ветеринария. – 2010. - № 2. - С. 3-6.
10 .Скрининг-тест для оценки патогенных свойств иммунных комплексов / Стручков П. В. [и др.] // Лаб. дело. — 1985. — № 7. — С. 410-412.
11. Роль иммунных комплексов при заболеваниях // Женева. – 1978. – Доклад Научной группы ВОЗ
12. Campbell W. C. Abamectin and Ivermectin / W. C. Campbell. – London : Springer-Verlag, 1989. – 210 p.

Контактная информации об авторах для переписки

Герунова Людмила Карповна — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».
E-mail: gerliud@mail.ru

Околелов Владимир Иванович — доктор ветеринарных наук, профессор, Заслуженный ветеринарный врач РФ, Начальник Главного управления ветеринарии, Главный государственный ветеринарный инспектор Омской области.

Пьянова Лидия Георгиевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ИППУ СО РАН.

Вовк Анастасия Андреевна — аспирантка кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».